

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY

As rescanning documents *will not* correct images,  
Please do not report the images to the Image Problem Mailbox

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
13. Juni 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/46401 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/12,  
C07K 14/74, C12N 5/10, A01K 67/027, A61K 48/00

Street, New Haven, CT 06511 (US). FÄNDRICH, Fred [DE/DE]; Moltkestrasse 4, 24105 Kiel (DE). GANTEN, Detlev [DE/DE]; Rathenaustrasse 11, 16431 Neu-Buch (DE). LIN, Xiongbin [CN/DE]; Schlossstrasse 21A, 24103 Kiel (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/04512

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
4. Dezember 2001 (04.12.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

**Veröffentlicht:**

(30) Angaben zur Priorität:  
100 61 334.9 4. Dezember 2000 (04.12.2000) DE

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF CELLS DERIVED FROM EMBRYONIC STEM CELLS FOR INCREASING TRANSPLANTATION TOLERANCE AND FOR REPAIRING DAMAGED TISSUE

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON AUS EMBRYONALEN STAMMZELLEN HERGELEITETEN ZELLEN ZUR ERHÖHUNG DER TRANSPLANTATIONSTOLERANZ UND ZUR WIEDERHERSTELLUNG ZERSTÖRTEN GEWEBES

(57) Abstract: The invention relates to the use of cells from cell lines, which are derived from early embryonic stages, for the donor-specific increase in transplantation tolerance and for repairing damaged tissue. Areas of application of the invention include the field of medicine and the pharmaceutical industry. The aim of the invention is to produce a donor-specific immunotolerance in order to prevent a rejection of the transplanted tissue due to an immune response and thus to be able to limit the administration of immunosuppressives. In order to produce a donor-specific immunotolerance, embryonic stem cell-like cell lines (ECL) are obtained from blastocysts and are transfected with genetic material of the donor, which codes for the MHC haplotypes. The cells produced in such a manner are administered to the recipient before the transplantation for producing an immunotolerance against the tissue to be transplanted or for regenerating already damaged tissue.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung von Zellen aus Zelllinien, die aus frühen Embryoalstadien abgeleitet werden, zur spenderspezifischen Erhöhung der Transplantationstoleranz und zur Wiederherstellung zerstörten Gewebes. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine spenderspezifische Immuntoleranz zu erzeugen, um eine Abstoßung des transplantierten Gewebes durch eine Immunreaktion zu verhindern und so die Verabreichung von Immunsuppressiva einschränken zu können. Für die Erzeugung einer spenderspezifischen Immuntoleranz werden embryonalen Stammzellen ähnliche Zelllinien (embryonic stem cell like cell lines, ECL) aus Blastozysten gewonnen und mit genetischem Material des Spenders, das für die MHC-Haplotypen kodiert, transfiziert. Die so erzeugten Zellen werden dem Empfänger schließlich vor der Transplantation zur Erzeugung der Immuntoleranz gegen das zu transplantierende Gewebe bzw. zur Erneuerung bereits geschädigten Gewebes verabreicht.

A1

WO 02/46401

**Verwendung von aus embryonalen Stammzellen hergeleiteten Zellen zur Erhöhung der Transplantationstoleranz und zur Wiederherstellung zerstörten Gewebes**

**Beschreibung:**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Zellen aus Zelllinien, die aus frühen Embryonalstadien abgeleitet werden, zur spenderspezifischen Erhöhung der Transplantationstoleranz und zur Wiederherstellung zerstörten Gewebes.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

**Stand der Technik:**

In der Transplantationsmedizin hat die Entwicklung zunehmend starker Immunosuppressiva wie Prednison, Cyclosporin, Tacrolimus, Mycophenolatmefetil und Antilymphozyt-Antikörper die Überlebensdauer der Patienten und die Verweildauer der Transplantate um durchschnittlich ein Jahr erhöht. Die routinemäßige Anwendung dieser Medikamente hat die klinische Transplantation zu einer Standardbehandlung gemacht, die für die meisten nichtmalignen terminalen Erkrankungen des Herzens, der Nieren und der Leber gewählt wird. Eine Verbesserung der frühen Überlebensdauer der Transplantate wurde jedoch nicht ohne eine beachtliche infektiöse Morbidität und nichtimmune Nebeneffekte (Gaber et al., Transplantation 66:29-37, 1998) erreicht. Darauf hinaus konnte eine bessere frühe Überlebensdauer nicht in eine bessere langfristige Überlebensdauer des Transplantates überführt werden, da die chronische Abstoßung weiterhin die Transplantate nach dem ersten Jahr in einer Häufigkeit, die sich in den letzten 20 Jahren im wesentlichen nicht verändert hat (Cecka and Terasaki, *Clinical Transplants* 1997, Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1998), funktionsunfähig gemacht hat. Außerdem zeigten sich bei längerem Verfolgen des klinischen Verlaufs von Transplantationen (Pirsch and Friedman, J. Gen. Intern. Med. 9:29-37, 1994) zunehmend eine späte Morbidität und Mortalität aufgrund der weiteren Notwendigkeit einer nichtspezifischen Immunsuppression.

Der Begriff der Immuntoleranz (nachfolgend als Toleranz bezeichnet), der allgemein mit dem Ausbleiben einer Immunreaktion nach Verabreichung oder Aufnahme eines bestimmten Antigens (AG) beschrieben werden kann, besitzt in der Transplantationsmedizin eine zentrale Rolle. Vom Standpunkt des Transplantationsimmunologen kann die Toleranz als anhaltende Persistenz eines Gewebes in Abwesenheit einer schädlichen Immunreaktion definiert werden, die ohne andauernden therapeutischen Eingriff erreicht werden kann. In diesem

Zusammenhang ist es wichtig festzustellen, daß die Toleranz keine angeborene Eigenschaft eines Individuums ist, sondern erworben wird (Owen, Science 102:400-401, 1945; Billingham et al., Nature 172:603-606, 1953). Es ist weiterhin bekannt, daß sich der tolerante Zustand, der bei der Geburt besteht, ständig verändert und zwar vor allem dann, wenn der Körper im Laufe des Lebens mit neuen Antigenen konfrontiert wird. Das Immunsystem muß z.B. in der Lage sein, bestimmte "fremde" Antigene, wie während der Pubertät und Schwangerschaft freigesetzte physiologische Hormone, zu tolerieren (Fowlkes and Ramsdell, Curr. Opin. Immunol. 5:873-879, 1993). Auch die Tatsache, daß sich fötales Leben entwickeln und in einem an *major histocompatibility complex* (MHC) nichtangepaßten Wirt überleben kann, ist ein weiteres Beispiel für die Fähigkeit der Natur, nicht nur zwischen fremd und nicht fremd, sondern auch zwischen gefährlich und ungefährlich unterscheiden zu können (Vacchio and Jiang, Crit. Rev. Immunol. 19:461-480, 1999).

Bei einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation ( $CD34^+$ ) wird eine erfolgreiche Transplantation in an MHC nichtangepaßten Wirten nur dann erreicht, wenn der Empfänger sublethal myeloablatiert oder bestrahlt wird.

#### Nachteile der bisherigen Organ- bzw. Gewebetransplantationen

Um eine Abstoßung des Transplantats durch eine Immunreaktion zu verhindern, werden gegenwärtig starke Immunsuppressiva verabreicht, die jedoch wiederum eine gesteigerte Infektanfälligkeit hervorrufen. So können ubiquitäre Keime, die bei einem normal funktionierenden Immunsystem keinerlei Gefahr darstellen, in einem immunsuppressiven Zustand schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen. Bei einer Blutstammzellttransplantation ( $CD34^+$ ) wird zum Beispiel eine erfolgreiche Transplantation in einen an MHC nichtangepassten Empfänger nur dann erreicht, wenn das Knochenmark des Empfängers vorher entfernt bzw. durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen zerstört wurde.

#### Aufgabenstellung:

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine spenderspezifische Immuntoleranz zu erzeugen, um eine Abstoßung des transplantierten Gewebes durch eine Immunreaktion zu verhindern und so die Verabreichung von Immunsuppressiva einschränken zu können.

#### Beschreibung der Erfindung:

Die Erfindung wird gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten. Für die Erzeugung einer spenderspezifischen Immuntoleranz werden embryonalen Stammzellen ähnliche Zelllinien (embryonic stem cell like cell lines, ECL) aus Blastozysten gewonnen und mit genetischem Material des Spenders, das für die MHC-Haplotypen kodiert,

transfiziert. Die so erzeugten Zellen werden dem Empfänger schließlich vor der Transplantation zur Erzeugung der Immuntoleranz gegen das zu transplantierende Gewebe bzw. zur Erneuerung bereits geschädigten Gewebes verabreicht.

Der Einsatz der Zellen aus den ECLs als "Toleranzvektoren" wird durch einen Mangel an MHC-Antigen-Expression und die damit verbundene immunogene Inaktivität der ECL eröffnet. Durch Untersuchungen wurde festgestellt, daß Zellen von ECLs transplantiert werden können und langfristig überleben, wobei sie hämatopoetische Zellen unterschiedlicher Abstammung erzeugen. Darüber hinaus haben diese aus ECL abgeleiteten hämatopoetischen Zellen einen ständigen gemischten Chimärismus erzeugt (hämatopoetische Zellen des Spenders und des Empfängers existieren nebeneinander im gleichen Wirt) und schaffen somit die Basis für eine langfristige Allo-Transplantatakzeptanz. Demzufolge können sie entweder als ideales Mittel für die Toleranzerzeugung eingesetzt werden oder alternativ in einer Situation Anwendung finden, in der die parenchymatöse Verletzung eines bestimmten Organs zu beheben ist.

Die Erfindung wird nachfolgend näher erläutert.

Für die ECL-Isolation wurden drei Rattenrassen gewählt, Wistar Kyoto (WKY), Sprague Dawley (SD) und ACI.

Aus diesen gewonnene Blastozysten wurden auf durch Mitomyzin inaktivierte Embryofibroblasten von Mäusen (MEF) oder Ratten (REF) als Versorger gepflanzt. Die MEF erwiesen sich als besser und beide, MEF und REF, waren eindeutig Gelatine überlegen. Wenn sich Auswüchse der inneren Zellmasse (ICM) nach dem Anwachsen der Blastozysten an die Versorgerschicht bildeten, konnten sie gewöhnlich leicht in Gruppen von ES-ähnlichen Zellklumpen (Primärklumpen) etwa 10 Tage lang erweitert werden (Primärwachstum). Danach differenzierten sich die Zellen weitgehend in ein Gemisch verschiedener Zelltypen und wurden bald von runden, locker angebundenen, endodermartigen Zellen überwachsen. Nur ein kleiner Teil der Zellen aus den Primärklumpen überlebte und wurde zu einer Zelllinie erweitert.

WKY-Blastozysten wuchsen sehr schnell an, zeigten ein starkes Primärwachstum und mehr als 10 % der Embryos erzielten ständige Zelllinien (Tabelle 1). SD-Blastozysten wuchsen mit etwas Verzögerung an, erzielten eine moderate Anzahl von Primärklumpen und die Effektivität der Zelllinienerzeugung war gering. ACI-Blastozysten brauchten die längste Zeit für das Anwachsen, erzeugten eine sehr kleine Zahl von Primärklumpen und keine Zelllinie konnte von dieser Rasse erzeugt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Geschwindigkeit, mit der sich die Blastozysten an die Versorgerzellschicht binden und die Anzahl der Primärklumpen während des größten Primärwachstums positiv mit der Effektivität der ECL-Ableitung verbunden (Tabelle 1) sind. Es ist interessant, daß bei den

Hybridblastozysten der WKY-Genotyp die ACI bei der Herstellung der ECLs schlägt, jedoch nicht den SD-Genotyp (Tabelle 1).

Der Einsatz der Zellen aus den Zelllinien, die aus den embryonalen Stammzellen erzeugt wurden, als "Toleranzvektoren" zur Herbeiführung einer spenderspezifischen Immuntoleranz bedingt weiterhin die Expression der spenderspezifischen MHC-Antigene. Diese Eigenschaft wird erfindungsgemäß dadurch erreicht, daß Zellen der ECLs mit den Genen des Spenders, die für die MHC-Antigene codieren, transfiziert werden. Dies kann durch (i) Fusion der ECL mit einer gegebenen somatischen Zelle oder Zelllinie erfolgen, die die MHC-Gene, die von Interesse sind, aufweist, durch (ii) Transfektion der ECL mit einem gegebenen MHC-kodierenden Plasmid, durch (iii) Schaffung transgener Ratten mit einem MHC-kodierenden Plasmid und die Erstellung von ECL von dieser Rasse oder durch (iv) Peptid-Beladung der ECL mit MHC-Allopeptiden der Klasse I, die für die hochpolymorphe  $\alpha_1$ -Helix eines spezifischen MHC-Antigens der Klasse I kodieren. Für die Verabreichung der transfizierten Zellen stehen verschiedene Varianten, z.B. über die Portalvene, durch intraperitoneale, subkutane oder intravenöse Injektion, zur Verfügung.

In der klinischen Praxis der Organtransplantation wird dadurch die Möglichkeit geschaffen, die Alloreaktion der Empfänger durch die Verabreichung von ECLs, die die spunderspezifischen MHC-Antigene exprimieren, zu modifizieren. Eine exakte Phänotypisierung und morphologische Charakterisierung der von ECL abgeleiteten Abkömmlinge ermöglicht, ähnliche Zellen mit Stammzellenmerkmalen im erwachsenen Wirt zu suchen. Dies ermöglicht, zu einem besseren Verständnis der Plastizität der aus einem erwachsenen Gewebe hergeleiteten Stammzellen zu kommen, die, alternativ zu den ECL, die ECL-Eigenschaften teilen und in ähnlicher Form verwendet werden können.

#### Ausführungsbeispiele:

##### **1. Isolation und Kultivierung der Ratten-ECL**

Mausembryofibroblasten (MEF) oder Rattenembryofibroblasten (REF) werden aus 13-14-Tage schwangeren Tieren bereitet, die mitotisch inaktiviert wurden durch 3 – 5 Behandlungen mit Mitomyzin C (10 µg/ml) 2 oder 1 Stunden lang, gewaschen mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) und in Nunc 4-Muldenschalen (well-dishes) gepflanzt. Die Blastozysten werden mit PBS/20 % FCS (fötales Kälberserum) oder einem Kulturmedium aus dem Uterus von 4,5 Tage schwangeren Ratten gespült, auf inaktivierte Embryofibroblasten gepflanzt und 3 – 4 Tage in DMEM/15 % FCS/2,500 µ/ml LIF („Leukemia inhibiting factor“, ESGRO, Life Technologies) mit Zusätzen (Iannaccone et al., Dev. Biol. 1994;163:288-292) in einem Medium von 6% CO<sub>2</sub>/Luft unbehandelt belassen. In dieser Zeit entwickeln sich die Blastozysten und binden sich an den Versorger, und die ICM beginnt zu wachsen, wobei die

Effizienz vom genetischen Hintergrund abhängt. Auswüchse mit einer ES-zellenartigen Erscheinung werden aufgenommen und in mehrere Klumpen zerbrochen durch Ansaugen in gezogene Glaskapillaren mit einem etwas geringeren Durchmesser als die Auswüchse und auf frische Versorgerplatten aufgebracht. Das Aufnehmen und Zerbrechen erfolgt entweder täglich oder jeden zweiten Tag. Zerfallene Kolonien werden reihenweise zurückgesetzt, bis man eine kleine Zahl sauberer, stabil wachsender ES-artiger Klumpen erhält. Die Population der Klumpen wird dann auf mehrere Dutzend erweitert, in 35 mm-Schalen aufbewahrt und leicht trypsinisiert in ein Gemisch einzelner Zellen und kleiner Aggregate. Die hergestellten Ratten-ES-Zellen wurden jeden oder jeden zweiten Tag durch Trypsinierung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA-4Na, 1 % Hühnerserum, in Ca/Mg-freier PBS) passagiert. Die Artenidentität der sich ergebenden Zelllinien wird durch PCR, unter Anwendung von Renin-Gen-Primern (Brenin et al., Transplant. Proc. 1997;29:1761-1765), geprüft, um eine Verunreinigung durch Maus-ES-Zellen auszuschließen.

## 2. Intraportale Injektion von WKY-abgeleiteten ECL in allogene Wirtsratten

Eine erste Reihe von Experimenten untersuchte das Schicksal einer einmaligen intraportalen Injektion von  $1,0 \times 10^6$  von WKY abgeleiteten ECL in allogene DA (RT1.<sup>av1</sup>)-Wirtsratten, die keinerlei immunsuppressive oder myeloablative Behandlung erhalten haben. Die Untersuchungen zeigen, daß diese Zellen langfristig ( $> 150$  Tage) in DA-Wirtsratten überleben können. Dabei wurde herausgefunden, daß die ECL und ihre Abkömmlinge einen Zustand eines ständig gemischten Chimärismus (Hämatopoetische Zellen des Spenders und des Empfängers bestehen nebeneinander im gleichen Wirt) erzeugen können. Weiterhin wurde herausgefunden, daß sich diese Zellen in hämatopoetische Zellen differenzieren, die MHC-Antigene der Klasse II (Ox-3) und B-Zellenabstammungsmarker (Ox-45) exprimieren. Der monoklonale Antikörper (mAb) Ox-3 ist ein spezifischer Antikörper eines (WKY)-MHC-Spenders der Klasse II, der sich an MHC-Epitope der Klasse II bindet, die an WKY exprimiert werden, jedoch nicht an positive DA MHC-Zellen der Klasse II. Eine fließzytometrische Bestimmung von doppelt gefärbten Leukozyten (WBC) ergab, daß 3 bis 5 % der WBC, die DA-Ratten entnommen wurden (100 Tage nach der ECL-Injektion), Ox-3<sup>+</sup>-Zellen exprimierten, wobei 15 – 20 % der Milzlymphozytenpopulation Ox-3<sup>+</sup> enthielten. Diese Ergebnisse weisen die Tatsache nach, daß ECL hämatopoetische Zellen erzeugen können. Dementsprechend wurden Ox-3<sup>+</sup>-Zellen histomorphologisch (10 – 15 %) im interstitiellen Raum der Empfänger- (DA-) Herzen nachgewiesen, die selektiv 100 Tage nach einer einmaligen intraportalen Injektion von  $1,0 \times 10^6$  von WKY abgeleiteten ECL zerstört wurden (siehe Abb.1).

Der stabile chimärische Zustand dieser Tiere schafft die Grundlage für die Untersuchung des Schicksals der WKY-Herzallotransplantats, die in DA-Ratten transplantiert wurden, sieben Tage nach der intraportalen ECL-Injektion. Kaplan Meier Diagramme zeigen, daß die Vorbehandlung der DA-Ratten mit  $1,0 \times 10^6$  ECL intraportal und die Herztransplantation (HTx) sieben Tage später zu einer langfristigen ( $> 150$  Tage) abstoßungsfreien Allotransplantatazeptanz führten, während nichtbehandelte DA-Ratten die WKY-Allografts akut abstießen (siehe Abb. 2). Gleichzeitig wurden die Herzallotransplantate von CAP Ratten von mit WKY-ECL injizierten DA-Ratten innerhalb von  $12,4 \pm 1,4$  Tagen abgestoßen, was die Immunkompetenz dieser Ratten beweist.

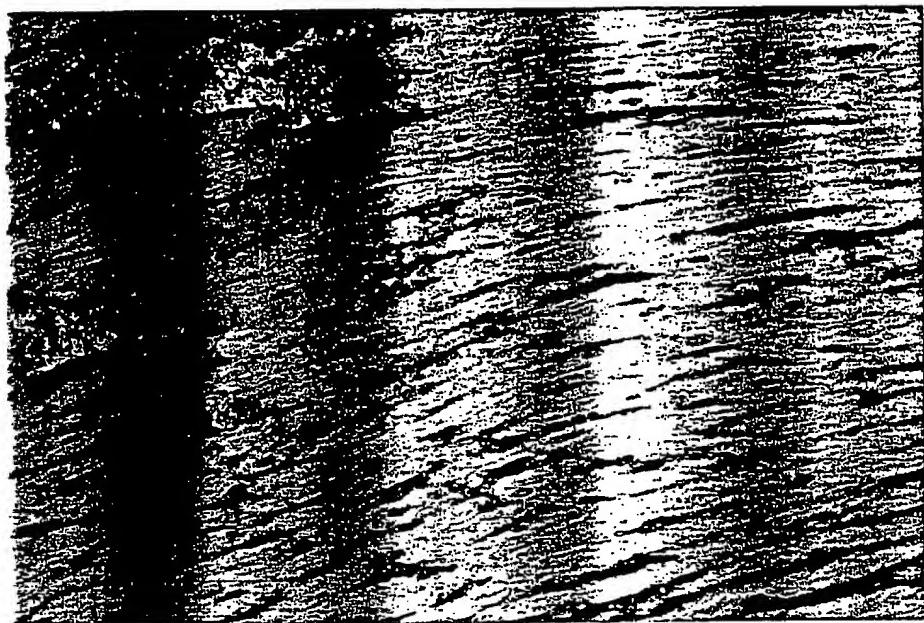
### 3. Ko-Kultivierung von ECL mit somatischen Zelllinien

In primären in vitro Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die zuvor beschriebenen ECL Zellen durch Ko-Kultivierung mit somatischen Zellen neuronalen oder entodermalen Ursprungs, eine Differenzierung in Astrozyten respektive Kardiomyozyten und Hepatozyten annehmen. Damit eignen sich die beschriebenen embryonalen Zelllinien auch zur Behandlung Organ-spezifischer Erkrankungen des Zentralnervensystems (z.B. als dopaminerge Zellen zur Behandlung des M. Parkinson, als Hepatozyten zur Behandlung der Leberzirrhose oder als Kardiomyozyten zur Behandlung frischer Herzinfarkte). Die nunmehr anstehende Isolierung der für diese spezifischen Differenzierungsformen notwendigen Signalproteine ist von großer klinischer Bedeutung, da sie ein problemloses Programmieren der ECLs zur gewünschten Zellpopulation ermöglichen konnte. Das Ziel besteht daher in der exakten Sequenzierung dieser Funktionsproteine, um deren rekombinante Herstellung zu ermöglichen. Die große Sequenzhomologie zwischen Ratten- und Menschprotein würde darüber hinaus auch Aufschlüsse zur analogen Herstellung menschlicher Funktionsproteine geben. Die damit verbundenen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten umfassen sowohl den voran beschriebenen Einsatz der ECL-abgeleiteten somatischen Zelllinien als auch der daraus abgeleiteten Funktionsproteine für den zukünftigen klinischen Einsatz auf allen Indikationsebenen des Tissue-Engineering zum Organersatz, für Gentherapie und zur Behandlung metabolischer Erkrankungen im Bereich des ZNS, der Leber und des Herzens.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Erzeugung einer spenderspezifischen Immuntoleranz gegen transplantierte Gewebe, dadurch gekennzeichnet, daß dem Empfänger vor der Transplantation Zellen verabreicht werden, die von frühen Embryonalstadien, z.B. Blastozysten, abgeleitet wurden („embryonal stem cell like cell lines“, ECL).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die verabreichten Zellen mit MHC-Genen und/oder Reportergenen transfiziert wurden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen mit den spunderspezifischen MHC-Genen transfiziert wurden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion durch eine Fusion der ECL mit einer somatischen Zelle oder Zelllinie erfolgt, die die spunderspezifischen MHC-Gene aufweisen.
5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion mit einem bestimmten MHC-kodierenden Plasmid erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion durch Schaffung transgener nichtmenschlicher Säugetiere mit einem MHC-kodierenden Plasmid und die Herstellung von ECL von diesen transgenen Tieren erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion durch Peptid-Beladung der ECL mit MHC-Allopeptiden der Klasse I, die für die hochpolymorphe  $\alpha_1$ -Helix eines spezifischen MHC-Antigens der Klasse I kodieren, erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die verabreichten Zellen mit einem LacZ-Plasmid transfiziert wurden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß Zellen von humanen Zelllinien eingesetzt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen 3-7 Tage vor der Transplantation zugeführt werden.

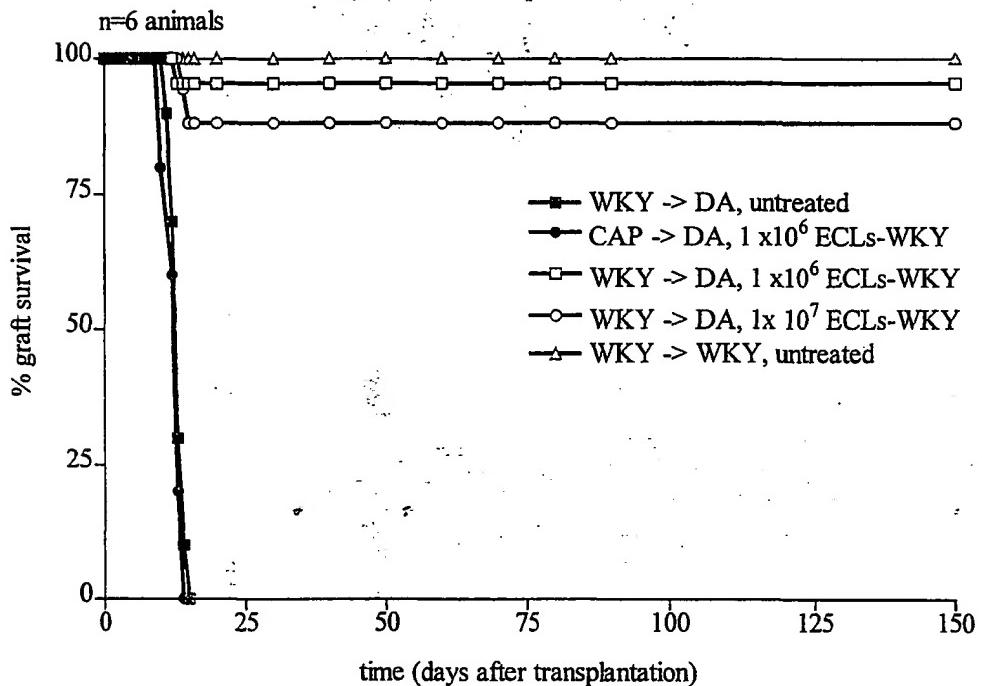
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen intravenös zugeführt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen intraportal zugeführt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen subkutan zugeführt werden.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen intraperitoneal zugeführt werden.
15. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die ECL Zelllinie als Ausgangszelle zur Differenzierung in neuronale Zellen mit spezifischer Transmitterfunktion (z.B Dopamin) programmiert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die ECL Zelllinie als Ausgangszelle zur Differenzierung in Hepatozyten zur Unterstützung der leber-spezifischen Metabolismen programmiert wird.
17. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die ECL Zelllinie als Ausgangszelle zur Differenzierung in Kardiomyozyten zur Regeneration der Herzmuskelfunktion programmiert wird.
18. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die infolge der Ko-Kultivierung gefundenen Signalproteine mit spezifischem Differenzierungspotential für neuronale Zellen (dopamin-produzierende Zellen), Hepatozyten und Kardiomyozyten als rekombinante Proteine hergestellt werden.



Ox-3<sup>+</sup> Zellen im DA-Empfänger-Herzen  
(APAAP-Färbung)

*Abb. 1*

*Überlebenskurven (nach Kaplan-Meier)  
nach heterotoper Herztransplantation im Rattenmodell*



Die heterotope Herztransplantation wurde in folgenden Rattenstammkombinationen für folgende Versuchsanordnungen durchgeführt: (■) WKY → DA, unbehandelt; (●) CAP → DA, vorbehandelt mit  $1 \times 10^6$  WKY-Stammzellen am Tag -7 vor Herztransplantation von CAP-Herzen (Drittstammkontrolle); (□) WKY → DA, vorbehandelt mit  $1 \times 10^6$  WKY-Stammzellen am Tag -7 vor Herztransplantation von WKY-Herzen; (○) WKY → DA, vorbehandelt mit  $1 \times 10^7$  WKY-Stammzellen am Tag -7 vor Herztransplantation von WKY-Herzen; (Δ) WKY → WKY, unbehandelt, syngene Kontrollgruppe

Abb. 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/DE 01/04512

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7	C12N15/12	C07K14/74	C12N5/10	A01K67/027	A61K48/00
-------	-----------	-----------	----------	------------	-----------

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 42838 A (MORPHOGENESIS INC) 1 October 1998 (1998-10-01)	1,2,8,9
Y	das ganze Dokument, insbesondere Seite 12 Zeile 27, Seite 2 Zeilen 6-7 und Anspruch 8	4,10-18
X	---	1-3,5-7
Y	WO 97 06241 A (GEN HOSPITAL CORP) 20 February 1997 (1997-02-20) das ganze Dokument, insbesondere Seite 13 Zeilen 10-12 und 16	4,10-18
X	---	1-4
Y	WO 00 12682 A (THOMSON JAMES A ;WISCONSIN ALUMNI RES FOUND (US)) 9 March 2000 (2000-03-09) the whole document	5-18
	---	-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

25 April 2002

22/05/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Julia, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

tional Application No

PCT/DE 01/04512

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C.A. HEATH: "Cells for tissue engineering" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 18, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 17-19, XP002197365 das ganze Dokument, insbesondere Seite 18 letzte vollständiger Absatz	1-4
Y	---	5-18
Y	J. GEARHART: "New potential for human embryonic stem cells" SCIENCE, vol. 282, no. 5391, 6 November 1998 (1998-11-06), pages 1061-1062, XP000941387 the whole document ---	1-18
Y	R.B. MANNON ET AL., : "Gene targeting : Applications in transplantation research" KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 56, no. 1, July 1999 (1999-07), pages 18-27, XP002197366 the whole document ---	1-18
Y	WO 98 37098 A (CAROSELLA EDGARDO DELFINO ;COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE (FR); KIR) 27 August 1998 (1998-08-27) das ganze Dokument, insbesondere Seite 5 Zeilen 15-17, Seite 6 Zeilen 13-15 und Seite 7 Zeilen 1-2 ---	1-18
Y	W. WONG ET AL., : "Haematopoietic stem cells transduced with a single donor class I histocompatibility complex gene can induce operational tolerance to fully allogeneic cardiac allografts" TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, vol. 31, no. 1-2, February 1999 (1999-02) - March 1999 (1999-03), page 886 XP001063290 the whole document ---	1-18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/DE 01/04512

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9842838	A 01-10-1998	AU EP WO	6869198 A 0972039 A1 9842838 A1		20-10-1998 19-01-2000 01-10-1998
WO 9706241	A 20-02-1997	AU EP JP WO US	723003 B2 6687696 A 0842266 A1 11510698 T 9706241 A1 6030833 A		17-08-2000 05-03-1997 20-05-1998 21-09-1999 20-02-1997 29-02-2000
WO 0012682	A 09-03-2000	AU EP WO	3881499 A 1117764 A1 0012682 A1		21-03-2000 25-07-2001 09-03-2000
WO 9837098	A 27-08-1998	FR CA EP WO JP*	2760023 A1 2251645 A1 0917538 A1 9837098 A1 2000510709 T		28-08-1998 27-08-1998 26-05-1999 27-08-1998 22-08-2000

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/04512

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/12 C07K14/74

C12N5/10

A01K67/027

A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBiete

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C07K C12N A01K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 42838 A (MORPHOGENESIS INC) 1. Oktober 1998 (1998-10-01)	1,2,8,9
Y	das ganze Dokument, insbesondere Seite 12 Zeile 27, Seite 2 Zeilen 6-7 und Anspruch 8	4,10-18
X	---	1-3,5-7
Y	WO 97 06241 A (GEN HOSPITAL CORP) 20. Februar 1997 (1997-02-20)	4,10-18
	das ganze Dokument, insbesondere Seite 13 Zeilen 10-12 und 16	
X	---	1-4
Y	WO 00 12682 A (THOMSON JAMES A ;WISCONSIN ALUMNI RES FOUND (US)) 9. März 2000 (2000-03-09)	5-18
	das ganze Dokument	
	---	
	-/-	

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
  - \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
  - \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
  - \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
  - \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
  - \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25. April 2002

22/05/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Julia, P

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/04512

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	C.A. HEATH: "Cells for tissue engineering" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 18, Nr. 1, Januar 2000 (2000-01), Seiten 17-19, XP002197365 das ganze Dokument, insbesondere Seite 18 letzte vollständiger Absatz	1-4
Y	J. GEARHART: "New potential for human embryonic stem cells" SCIENCE, Bd. 282, Nr. 5391, 6. November 1998 (1998-11-06), Seiten 1061-1062, XP000941387 das ganze Dokument	5-18
Y	R.B. MANNON ET AL., : "Gene targeting : Applications in transplantation research" KIDNEY INTERNATIONAL, Bd. 56, Nr. 1, Juli 1999 (1999-07), Seiten 18-27, XP002197366 das ganze Dokument	1-18
Y	WO 98 37098 A (CAROSELLA EDGARDO DELFINO ; COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE (FR); KIR) 27. August 1998 (1998-08-27) das ganze Dokument, insbesondere Seite 5 Zeilen 15-17, Seite 6 Zeilen 13-15 und Seite 7 Zeilen 1-2	1-18
Y	W. WONG ET AL., : "Haematopoietic stem cells transduced with a single donor class I histocompatibility complex gene can induce operational tolerance to fully allogeneic cardiac allografts" TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, Bd. 31, Nr. 1-2, Februar 1999 (1999-02) - März 1999 (1999-03), Seite 886 XP001063290 das ganze Dokument	1-18

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffe

igen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/04512

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9842838	A	01-10-1998	AU EP WO	6869198 A 0972039 A1 9842838 A1		20-10-1998 19-01-2000 01-10-1998
WO 9706241	A	20-02-1997	AU EP JP WO US	723003 B2 6687696 A 0842266 A1 11510698 T 9706241 A1 6030833 A		17-08-2000 05-03-1997 20-05-1998 21-09-1999 20-02-1997 29-02-2000
WO 0012682	A	09-03-2000	AU EP WO	3881499 A 1117764 A1 0012682 A1		21-03-2000 25-07-2001 09-03-2000
WO 9837098	A	27-08-1998	FR CA EP WO JP	2760023 A1 2251645 A1 0917538 A1 9837098 A1 2000510709 T		28-08-1998 27-08-1998 26-05-1999 27-08-1998 22-08-2000

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**